

細菌細胞形態に関する超薄切片法応用 による電子顕微鏡的研究

第 3 編

細菌芽胞の形成過程に就いて

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

菅 昌 夫

〔昭和 34 年 3 月 25 日受稿〕

目 次

緒 言
第 1 章 実験材料及び実験方法
第 1 節 実験材料
第 2 節 実験方法
第 2 章 実験成績
第 1 節 枯草菌

第 2 節 脾脱疽菌
第 3 章 総括及び考按
結 語
引用文献
写真説明

緒 言

芽胞を形成する菌の多くは桿状菌に属し、桿状の發育型菌体の老熟にともなつて、その一端、或は中央部、又は中央と端との中間部に、核物質の濃縮と思われる光屈折度の高い円形乃至楕円形の芽胞が形成される。この芽胞が完全に発達して来ると、外側の發育型細菌は崩壊して芽胞は裸状態で遊離される。更にこの芽胞が發育好適条件下に置かれると発芽する。即ち、発芽進行に伴い發育型細胞が芽胞膜を破壊して露出し、空殻は捨てられ發育型菌体となる。更に進むと、發育型菌体は常法で分裂増殖し、その老熟とともに再び菌体内の核物質が濃縮し芽胞が形成される。以上の如き一定の循環的過程を経て、芽胞は形成され発芽されるものとされている。

この様に、芽胞の菌体内形成過程並びに発芽過程はかなり明らかにされて来たし、それに関する研究報告も極めて多い。その主たるものが、*Bacillus mycoides* に於て見られる芽胞の菌体内形成過程、並びに発芽過程を電子顕微鏡的に観察した Knaysi (1945)¹⁾ 或は Knaysi, Barker and Hillier (1947)²⁾ 並びに Knaysi and Barker (1947)³⁾ 等の研究報告、又、Robinow (1953)⁴⁾ の *Bacillus megaterium* に

ついで、Smith and Ellner (1957)⁵⁾ の *Clostridium perfringens* についての、光学顕微鏡並びに位相差顕微鏡による観察報告、或は、Robinow (1953)⁶⁾、Chapman (1956)⁷⁾ の *Bacillus cereus* 及び *Bacillus megaterium* についての、並びに *Clostridium sporogenes* についての Hashimoto and Naylor (1958)⁸⁾ の、夫々超薄切片法応用による電子顕微鏡的研究報告である。

然し、これ等の報告に於ける所見は、必ずしも一致していないし、電子顕微鏡的知見 (特に超薄切片法応用による電子顕微鏡的知見) により補足しなければならない点を数多く残している。この事は、芽胞の菌体内形成過程及び発芽過程に於て観察される種々の微細構造が非常に複雑である為であろうと考えられるし、又同時に、菌の種類によりその芽胞形成及び発芽の過程に差異が存在することを暗示するものであると考えられる。

そこで著者はこれ等幾多の問題を考慮しつつ、本編に於いては枯草菌並びに脾脱疽菌に見られる芽胞の菌体内形成過程を超薄切片法を応用して電子顕微鏡的に追究した。

第1章 実験材料及び実験方法

第1節 実験材料

使用細菌： 当教室保存の枯草菌，及び脾脱疽菌を使用した。

培養： 夫々普通寒天培地に6時間乃至10日間(37°C フラン器中) 培養の菌を用いた。

超薄切片用試料作製に際し使用した薬剤： 第1編と同じ。

切断時に使用したナイフ，及びアルコール・ポット： 第1編と同じ。

使用マイクローム，及び電子顕微鏡： 第1編と同じ。

第2節 実験方法

固定前の処置： 第1編と同じ。

固定： 6時間～18時間培養の枯草菌，及び脾脱疽菌に於ては，6時間～12時間の固定を行い，培養時間が24時間以上の菌に於ては18時間～20時間の固定を行った。その他の固定に際しての実験方法は第1編と同じ。

水洗，脱水，包埋，包埋細菌の切断と鏡検までの処置及び電子顕微鏡による鏡検： これ等は全て第1編と同じ。

第2章 実験成績

一定した適当な訳語のないものは混乱をさける為、欧語の儘を使用した。

第1節 枯草菌

従来，芽胞は発育型細菌の老熟菌体の中央部，或は一端部に形成され，核物質の濃縮物と思われる光屈折度の高い円形乃至楕円形のものとしてされている。

写真1は6時間培養枯草菌の縦断像である。発育型菌体内に見られる nuclear element は，島状乃至点状を呈し，細胞壁と同心円的に散在し，或は一部帯状に連結して存在している。この nuclear element が菌体の一端乃至中央部に於て，次第に球状に濃縮し(写真2～4，何れも10時間培養)，遂には写真5(18時間培養菌)に於て見られる如く，電子密度の低い，かなり輪廓の整つた一個の塊状を呈する若い前芽胞となる。尚，写真5に於て見られる発育型菌細胞質顆粒は，写真1～4に於て認められたそれよりも，幾分粗大であり，密集度も低下している様に思われる。この若い前芽胞は，写真6及び7(何れも24時間培養菌)に於て見る如く，中央部より周辺部へと電子密度を増しつつ，外側に

outer coat 並びに exosporium を形成し前芽胞となる。写真8～10(何れも3日培養菌)に於ては，外側より sporangium wall, exosporium, outer coat が認められ，芽胞質は幾分収縮し，極端に電子密度を増している。更に写真11～16(写真11～15は何れも3日培養菌，写真16は5日培養菌)に於て見られる如く，芽胞質の電子密度は徐々に低下し，それにとりなつて inner coat, core 及び cortex が認められる様になり菌体内芽胞が完成される。

即ち写真11に於て，芽胞質の中央部は電子密度が低下し，exosporium はちぢれ波状を呈している。次に写真12～15に於ては，芽胞質の電子密度は中央部が高く，周辺部は幾分低くなつており，core 及び cortex の存在が考えられる。写真16は完全に成熟した菌体内芽胞の切片像であり，外側より sporangium wall, exosporium, outer coat, inner coat, 及び cortex, core, 更に nuclear element (nuclear element は電子密度の低いものとして認められる)等を明瞭に見出すことが出来る。

写真17～20(何れも5日培養菌)は，菌体内に形成された芽胞が，菌体(sporangium)外に脱出して行く過程を示すものである。即ち，写真19に見られる如く sporangium に於ける sporangium wall の一部，及び exosporium の一部が膨隆し，更に写真20ではこの膨隆部が破壊し，写真23にみる如き outer coat と inner coat のみをもつた芽胞自体が遊離して来る。

又，写真17及び18の如く sporangium wall のみの一部が破裂し，outer coat 及び inner coat の他に exosporium を併せ持つた形の芽胞(写真22, 24, 夫々5日培養枯草菌芽胞)が遊離してくる場合もある。この形のものは，更に exosporium が破裂し(写真21, 24何れも7日培養枯草菌芽胞)，outer coat と inner coat のみを持つ芽胞(写真23)が遊離して来る，exosporium のみと思われる写真[写真21の右上方及び25(7日培養枯草菌芽胞)]が得られた事も，この事を暗示するものと考えられる。

尚，outer coat と inner coat のみを持つ芽胞に比して，exosporium を併せもつものの方がはるかに多く観察された。

第2節 脾脱疽菌

著者の観察した脾脱疽菌菌体内芽胞は，他の研究者のそれよりも幾分異つた像を呈した。故に，以後示す種々の写真像が明確に菌体内芽胞に相当するものかどうか断定し難いが，一応菌体内芽胞を示すも

のではないかと考えられた。

写真27~35は、菌体内に散乱して認められる nuclear element が一箇所へ徐々に濃縮し、非常に電子密度の低い円形乃至楕円形の一塊となる、所謂若い菌体内芽胞が完成される迄の過程を示唆するものである。即ち、nuclear element は最初菌体内に散乱しているが(写真27, 18時間培養)それが次第に菌体の中軸部に凝縮し(写真28, 29何れも24時間培養菌)、更にその一部分が円形乃至楕円形となり(写真30, 36時間培養菌)、その周辺に存在する nuclear element はその部位に移動し大きさを増す(写真31~34, 写真31は36時間培養菌, 32~34は2日培養菌)。それにともないその円形乃至楕円形構造物に対応する菌体部分が膨隆して来る(写真32~34)。続いてこれ迄に見られていた電子密度の高い所謂 nuclear apparatus に相当するものは、全く消滅し完全に円形乃至楕円形化した幼若菌体内芽胞が形成されて来る(写真35, 36何れも3日培養菌)。写真36に於て見られる幼若菌体内芽胞の周辺部には、電子密度の高い spore coat に相当するものが認められる。写真37(5日培養菌)に於て観察されるものは、外少異つた様相を呈している。即ち、写真37の脾脱疽菌菌体内に於ては、電子密度の低い大小異なる3個の円形状構造物が観察され、これが前述した幼若菌体内芽胞と同じものであるかどうかは断言し難い。写真32に於ては、非常に長い細胞の一端部に形成されつつある若い菌体内芽胞を認める事が出来る。

写真39に於て見られる各々の菌体内幼若芽胞は、夫々大きさを異にし、中央部菌体内に認められるものは、菌体外に脱出せんとする像であると思われるが、それらの何れの細胞にも18~24時間培養菌に於て認められた様な核装置は全く認められない。写真40は10日培養脾脱疽菌に於て見られる菌体内芽胞像であるが、これは3日或は5日培養脾脱疽菌に於て見られるそれと全く変らない。

尚、2日~5日培養芽胞形成菌に於ては、菌体両端部に電子密度の極めて低い小空胞様構造の形成を認めたが(特に写真32, 33, 37, 39)、この意義については不明である。

第3章 総括及び考按

Cohn (1875) が特殊細菌体内に於て、芽胞が形成されるのを認め、Koch (1876) がその性質を詳細に報告して以来、芽胞に関する研究は核装置の研

究に並行し著しく増大して来た。著者は緒言に於て、既報の細菌芽胞の菌体内形成過程に関する知見を概観的に敘述した。今日これ等の光学顕微鏡並びに位相差顕微鏡的研究による所見は、電子顕微鏡並びに超薄切片法応用による電子顕微鏡的知見によつて補足され、一段と明瞭にされて来ているが、それ等の所見は必ずしも相互に一致していない。即ち、Chapman (1956)⁷⁾ は *Bacillus megaterium*, 及び *Bacillus cereus* に於て観察される芽胞の菌体内形成過程を超薄切片法を応用して電子顕微鏡的に追究し、*Bacillus megaterium* に於ては、細胞質の一部(主に一端部)が電子密度を増し、その部分の外側に、或は電子密度には変化なくして細胞質の一部に幾分電子密度の高い outer coat が形成され、次いでその内側に inner coat が見られ、exosporium は認められなかつたと記述している。一方 *Bacillus cereus* に於ては、nuclear site の集りと思われる電子密度の低い部分が形成され、その部分が次第に電子密度を増すとともに、exosporium, outer coat, 及び inner coat の三層の spore coat が形成されて来ること、又芽胞質は、core 及び cortex, 更に nuclear element に区別されることを敘述している。更に、Hashimoto 等 (1958)⁸⁾ は *Clostridium sporogenes* に於て、outer coat の二層構造を認めたと報告している。又、Smith 等 (1957)⁹⁾ は *Clostridium perfringens* の芽胞形成過程を光学顕微鏡的に観察し、core に core membrane の存在する事を報告している。

著者の実験に於て、枯草菌芽胞の菌体内形成過程は Chapman (1956)⁷⁾ の報告した *Bacillus cereus* に於けるものに類似していた。即ち、初め菌体内に分散して認められる nuclear element は、培養時間の経過に伴つて、菌体中央部乃至一端部に円形乃至楕円形状に濃縮する。形成されたそのものは、初めは非常に電子密度の低いものであるが、徐々に電子密度を増し、それに伴つて outer coat 及び exosporium が形成され、遂には inner coat, 及び cortex と core, 更に nuclear site が認められる様になり菌体内芽胞が完成する。

次に、菌体内に完成された芽胞の sporangium 外脱出に於て、outer coat 及び inner coat の二層の spore coat のみをもつて遊離する芽胞と、それに exosporium を加えた三層の spore coat をもつて遊離する芽胞との二形が観察された。前者は Chapman (1956)⁷⁾ の敘述した *Bacillus megaterium*

に於る芽胞形に、後者は *Bacillus cereus* に見られたそれに夫々類似するものである。しかしながら著者の実験範囲内では、枯草菌の芽胞には exosporium, outer coat 及び inner coat の三層から成るものがより多く観察された。更に、この三層からなる芽胞の exosporium が破裂して outer coat と innercoat のみを有する芽胞に変化して行く過程も認められた。

尚、Hashimoto 等 (1958)⁸⁾ が敘述している二層構造の outer coat 及び Smith 等 (1957)⁵⁾ の報告の中に見る core membrane なる構造物は認め難かつた。

Bacillus subtilis の菌体内芽胞形成過程の一部は、既に吾国の高木等 (1956)⁹⁾ に依つて報告されているが、前述の著者の研究はこの形成過程をより詳細な点にわたつて明らかにしたものと云える。

一方、脾脱疽菌芽胞の菌体内形成過程も、Chapman (1956)⁷⁾ の *Bacillus cereus* に於るそれとほぼ同一であつたが、形成された幼若菌体内芽胞は電子密度を増加する事もなく、構造にそれ以上の変化は観察されなかつた点で大いに變つている。この事からこの構造物は空胞とも推測されるが、nuclear site の濃縮物であり、又ほとんどの菌体内に1個のみが観察され、又時折その構造物の周囲に spore coat と考えられるものが認められ、3~5日培養菌に於て、この構造物とは別に小空胞様構造物が観察され、又、その菌体内の位置及び形状等は染色標本の光学顕微鏡像に於て観察される芽胞と極めてよく一致した。これ等の点から考えて、この構造物は脾脱疽菌の菌体内芽胞に他ならないと推定する。

吾国の鈴木 (1957)¹⁰⁾ が炭疽菌の菌体内芽胞形成過程に就いて研究し、初め細胞が濃縮部と非濃縮部とに分れ、その非濃縮部には腔胞様封入体が形成され、他方濃縮部は nuclear site に相当するものであり、前芽胞は細胞質膜で囲まれた円形の濃縮部分として形成されると報告しているが、著者等の結果は前述の如くこの報告所見とはかなり相異なる。

尚脾脱疽菌に於ては、sporangium より遊離した状態の芽胞は認められなかつたが、この点は尚、今後の研究に俟たねばならない。

結 語

枯草菌、及び脾脱疽菌の芽胞形成過程を超薄切片法を応用し電子顕微鏡的に追究し、次の如き所見を得た。

I 枯草菌に於ける菌体内芽胞形成過程に就いて
1) 初め nuclear element は、cell wall と同円心的に散在して認められる。

2) この nuclear element が時間の経過に伴い、菌体の中央部或は一端部に濃縮し、電子密度の低い毬状の若い前芽胞となる。

3) 更に時間の経過とともに、これは電子密度を増し、それに伴つて outer coat と exosporium が形成され前芽胞となる。

4) 更に進むと芽胞質は収縮し急激に電子密度を増し、sporangium wall, exosporium, 及び outer coat が明確に区別出来る様になる。

5) 次に、その芽胞質の電子密度は徐々に低下し、それに伴つて inner coat, cortex, core, 及び nuclear site が認められる様になる。

6) 遂には sporangium wall, exosporium, outer coat 及び inner coat の諸層、更にその内部に cortex, core, 及び nuclear site からなる芽胞質が形成され、菌体内芽胞の形成過程が終る。

7) 更に、sporangium wall の一部が破裂し、exosporium, outer coat, inner coat の三層の spore coat を有する芽胞が遊離される。

8) 或は又、sporangium wall, exosporium の両者が破裂し、outer coat, inner coat の二層の spore coat を有する芽胞が遊離する。

9) 更に、exosporium, outer coat, inner coat の三層の spore coat を有する芽胞に於て、exosporium が破裂し、outer coat, inner coat の二層の spore coat を有する芽胞となる場合もある。

10) 但し、三層 (exosporium, outer coat 及び inner coat) の spore coat を有する芽胞は、二層 (outer coat 及び inner coat) の spore coat を有するものに比してはるかに多数認められた。

II 脾脱疽菌に於る菌体内芽胞の形成過程に就て

1) 初め nuclear element は菌体周辺部に散在して認められる。

2) それが時間の経過に伴つて、菌体の中軸部に带状に凝縮する。

3) この一部が円形乃至楕円形状に軽度に濃縮する。

4) この周囲に存在する nuclear element は、この部位に集り、電子密度の低い円形乃至楕円形状の構造物を形成し、幼若菌体内芽胞となる。

5) その周辺部に spore coat と思われるものを認める事もあつた。

6) この幼若菌体内芽胞と思われるものは、その電子密度を全く増加しなかつた。

7) 又、sporangium より遊離した芽胞は観察されなかつた。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上栄教授に深甚なる謝意を表し、又実験に際し種々御援助下さつた教室の俵助教授、矢部博士、更に技術面に於て御協力下さつた教室の林氏、電子顕微鏡室の黒田、林両氏に心より感謝致します。

引用文献

- | | |
|---|--|
| 1) Knaysi, G. : J. Bact., 49, 473~491 (1945) | 7) Chapman, G. B. : J. Bact., 71, 348~355 (1956) |
| 2) Knaysi, G., Barker, R. F. and Hillier, J. : J. Bact., 53, 527~537 (1947) | 8) Hashimoto, T. and Naylor, H. B. : J. Bact., 75, 647~653 (1958) |
| 3) Knaysi, G. and Barker, R. F. : J. Bact., 53, 539~553 (1947) | 9) 高木篤, 川田十三夫, 久保忠彦, 中田嘉則, 岩谷道雄 : 電子顕微鏡, Vol. 5, No. 1, 37~38 (1956) |
| 4) Robinow, C. F. : J. Bact., 65, 378~382 (1953) | 10) 鈴木成美, 谷野輝雄, 望月成大, 苗加文雄, 重松保引 : 電子顕微鏡, Vol. 6, No. 1, 2, 82~84 (1957) |
| 5) Smith, A. G. and Ellner, P. D. : J. Bact., 73, 1~7 (1957) | |
| 6) Robinow, C. F. : J. Bact., 66, 300~311 (1953) | |

写真説明

- 写真 1) 6時間培養枯草菌。Nuclear element は cell wall と同円心的に散在している。
- 写真 2) 10時間培養枯草菌。Nuclear element は菌体両端部、特に右端部に凝集しつつある。
- 写真 3) 12時間培養枯草菌。
- 写真 4) 12時間培養枯草菌。
- 写真 5) 18時間培養枯草菌。Nuclear element が毬状に濃縮した、若い前芽胞を見る。
- 写真 6) 24時間培養枯草菌。若い前芽胞は電子密度を増し、outer coat, 及び exosporium が見られる。
- 写真 7) 24時間培養枯草菌。若い前芽胞は一様に電子密度を増し、所謂前芽胞となる。
- 写真 8) 3日培養枯草菌。前芽胞芽胞質はやや収縮し、極度に電子密度を増している。
- 写真 9) 3日培養枯草菌。
- 写真 10) 3日培養枯草菌。外側より sporangium wall, exosporium, 及び outer coat が明瞭に認められる。
- 写真 11) 3日培養枯草菌。前芽胞芽胞質の電子密度はやや低下しつつある。
- 写真 12) 3日培養枯草菌。
- 写真 13) 3日培養枯草菌。
- 写真 14) 3日培養枯草菌。前芽胞はやや収縮している。
- 写真 15) 3日培養枯草菌。
- 写真 16) 5日培養枯草菌。外側より sporangium wall, exosporium, outer coat, 及び inner coat の諸層を認め、芽胞質は cortex, core, 及び nuclear site に区別出来る、成熟菌体内芽胞である。
- 写真 17) 5日培養枯草菌。左側部 sporangium wall は破壊しているが、exosporium は正常状態である。
- 写真 18) 5日培養枯草菌。
- 写真 19) 5日培養枯草菌。Sporangium wall 及び exosporium は膨隆し、菌体内芽胞の脱出を思わせる。
- 写真 20) 5日培養枯草菌。右側部 sporangium wall 及び exosporium は破壊されている。

- 写真 21) 24時間培養枯草菌芽胞。上部芽胞に於て exosporium の遊離を見る。
- 写真 22) 4日培養枯草菌芽胞。exosporium, outer coat, inner coat の三層の spore coat を持つ芽胞。
- 写真 23) 5日培養枯草菌芽胞。outer coat, inner coat, inner coat の二層の spore coat を持つ芽胞。
- 写真 24) 3日培養枯草菌芽胞。三層の spore coat を持つ芽胞。
- 写真 25) 3日培養枯草菌芽胞の eposporium の像。
- 写真 26) 3日培養枯草菌。成熟した菌体内芽胞。(写真16に類似する像)。
- 写真 27) 18時間培養脾脱疽菌。Nuclear element は菌体内に散乱している。
- 写真 28) 24時間培養脾脱疽菌。Nuclear element は菌体の中軸部に帯状に凝集している。
- 写真 29) 36時間培養脾脱疽菌。
- 写真 30) 36時間培養脾脱疽菌。帯状の Nuclear element の一部が円形化している。
- 写真 31) 36時間培養脾脱疽菌。
- 写真 32) 2日培養脾脱疽菌。Nuclear element は毬状に濃縮しつつある。
- 写真 33) 2日培養脾脱疽菌。
- 写真 34) 2日培養脾脱疽菌。
- 写真 35) 3日培養脾脱疽菌。幼若菌体内芽胞を見る。
- 写真 36) 3日培養脾脱疽菌。幼若菌体内芽胞の周辺部に spore coat 様の構造物を見る。
- 写真 37) 5日培養脾脱疽菌。菌体内に電子密度の低い3ヶの毬状の構造物を見る。
- 写真 38) 5日培養脾脱疽菌。長い菌体の左端部に形成されつつある幼若菌体内芽胞を見る。
- 写真 39) 5日培養脾脱疽菌。大小異なる幼若菌体内芽胞を見る。中央に見られる幼若菌体内芽胞は、Sporangium 外に脱出せんとする。
- 写真 40) 10日培養脾脱疽菌。幼若菌体内芽胞は3日~5日培養脾脱疽菌に於て見られたものと変らない。

Electron Microscopic observations on Bacteria by Ultra-thin Section Technic

III: Electron Microscopic observation on Spore Formation

By

Masao Suga

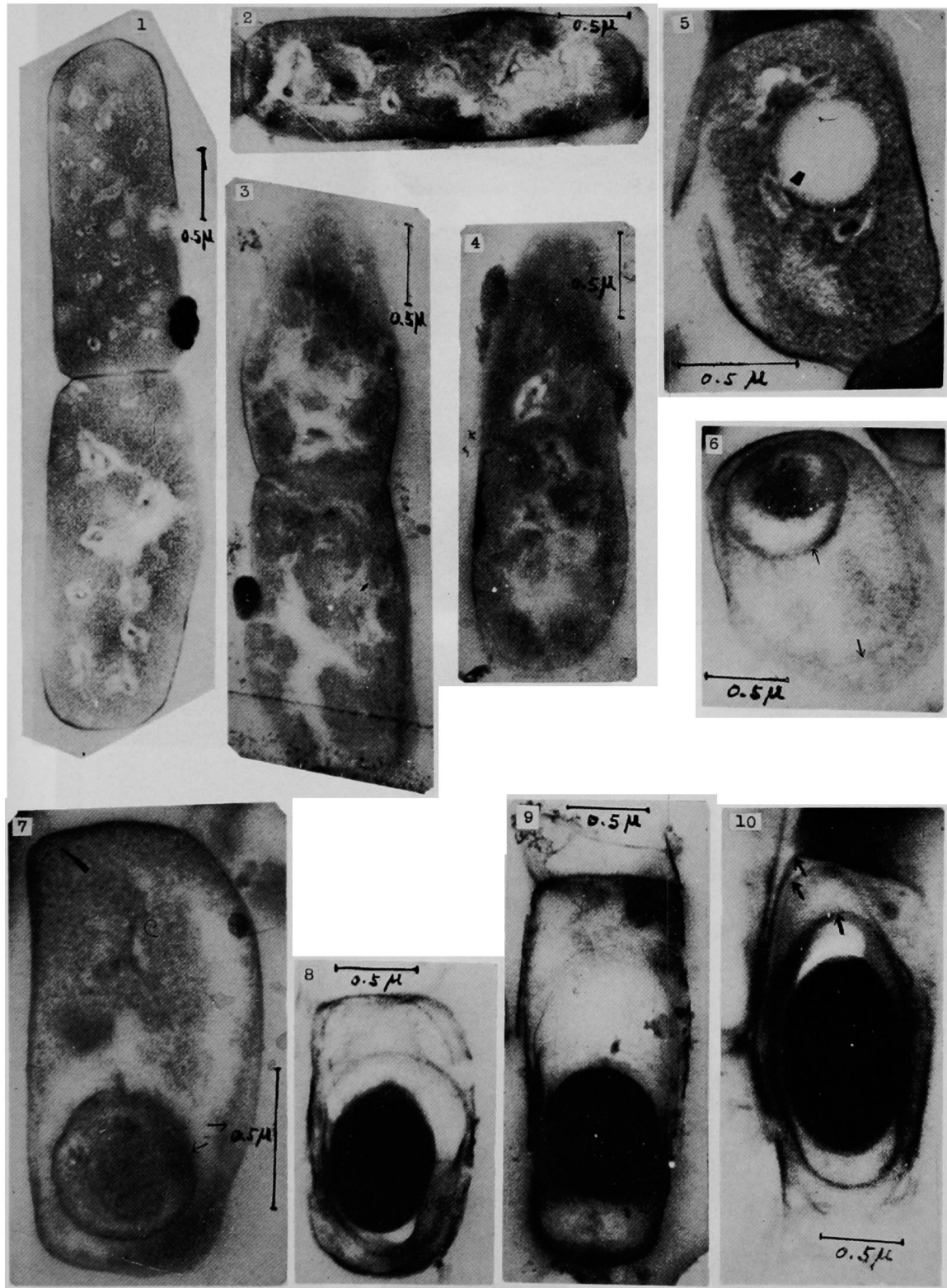
Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. Sakae Murakami)

By means of electron microscope and ultra-thin section technic, the author studied the spore fotation process of *B. subtilis* and *B. anthracis*. The results are briefly summarized as follows;

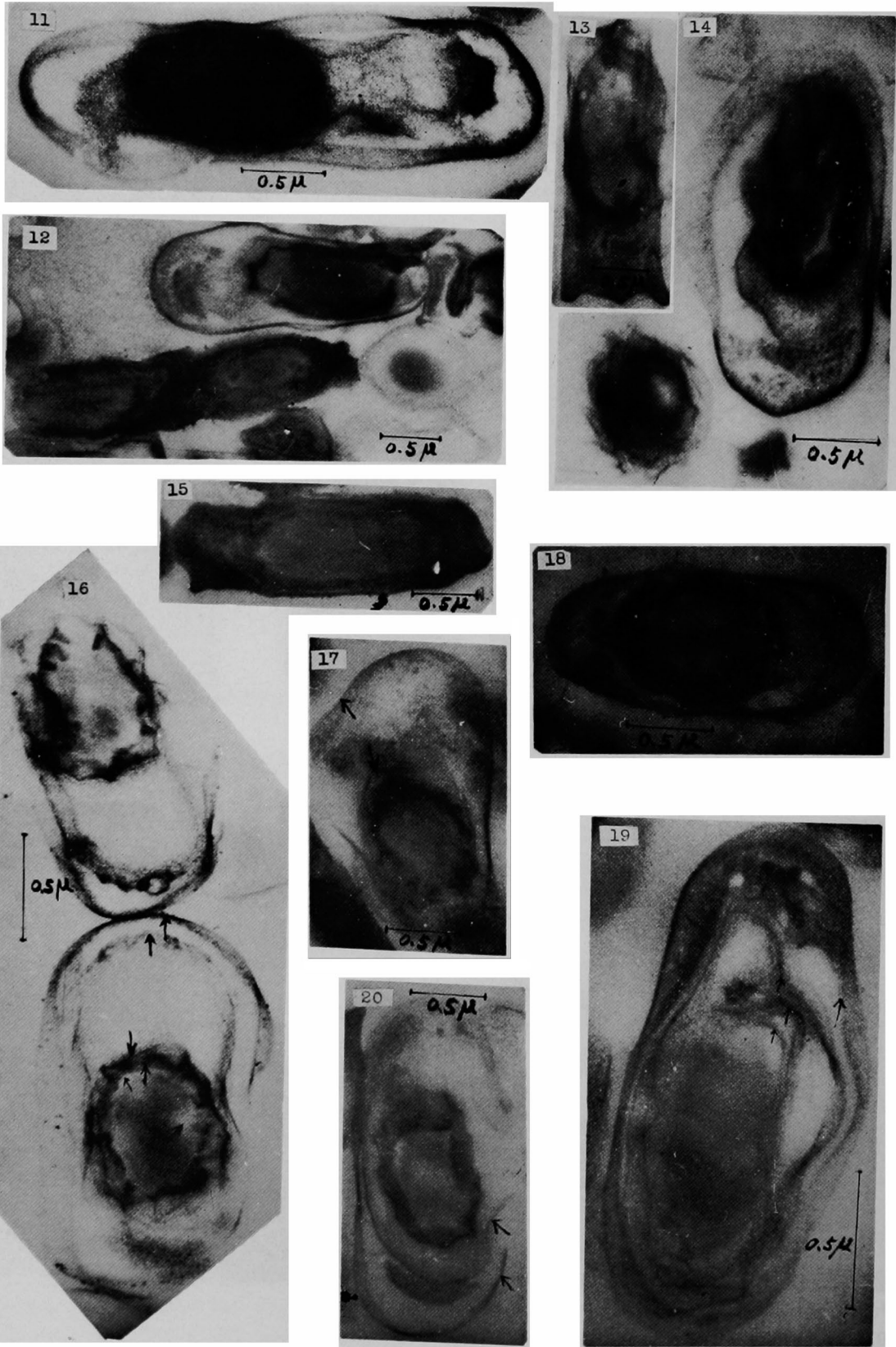
1) The nuclear sites present dispersedly in the cell gradually condense into globe-like young pre-spore in the middle or at the one end of bacterial cell; it increases its electron dencity with the lapse of time and the the outer coat and the exosporium is formed; the pre-spore condences and increases its electron dencity forming complete intracellular spore with the sporangium wall, the exosporium, the outer and inner coats outside of it, and with the cortex, the core and the nuclear site inside of it. The sporangium well teart, freeing the spore with exosporium, outer and inner coats. In some ones, both of the sporangium wall and the exosporium tear and the spore with the outer and inner coats is freed. The spore with three coats, the exosporium, the outer and inner coats, sometimes tears its exosporium and frees the spore with the rest two coats. However, the spores with three spore coats are much more than the ones with two coats.

2) In *B. anthracis*, the dispersed nuclear sites condense into oval or round structure which can be considered the young spore. In some ones, spore coat-like structure can be observed. However, the young intracellular spore never increased its electron dencity, and no cell-free spore could be observed.

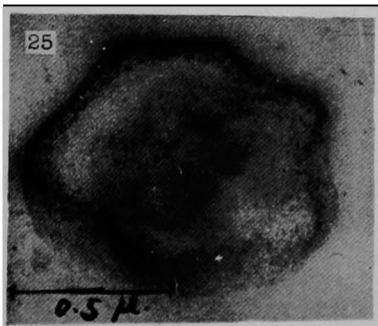
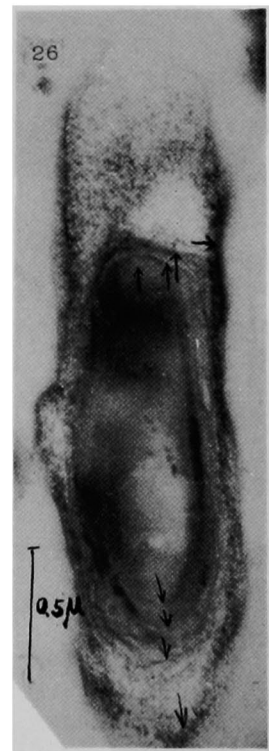
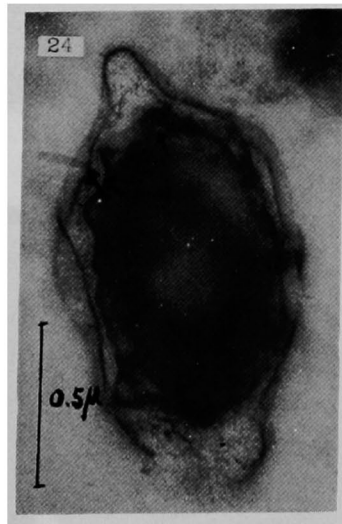
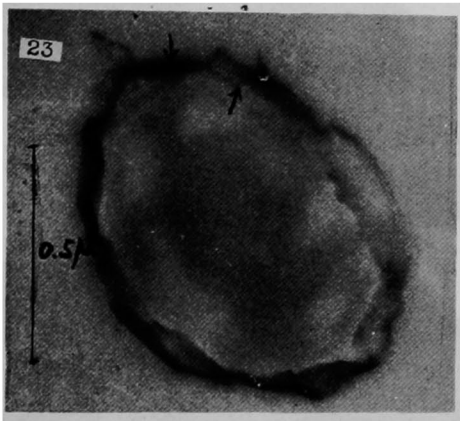
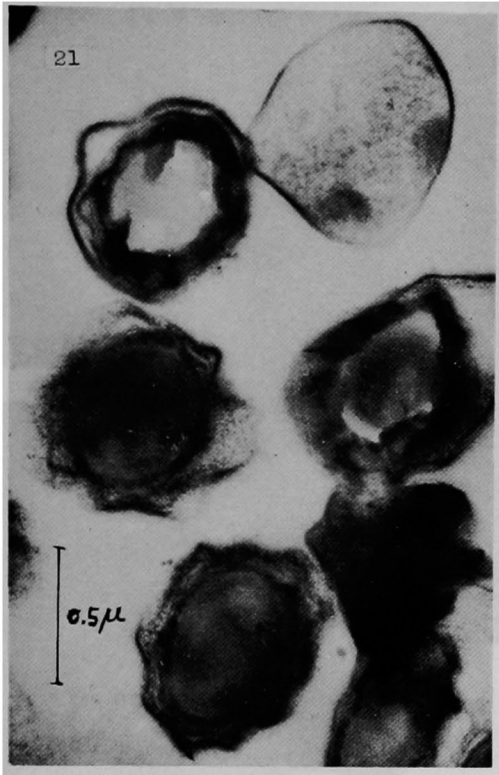
菅論文附図



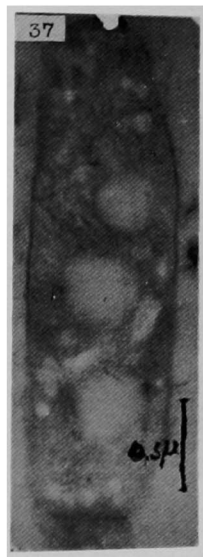
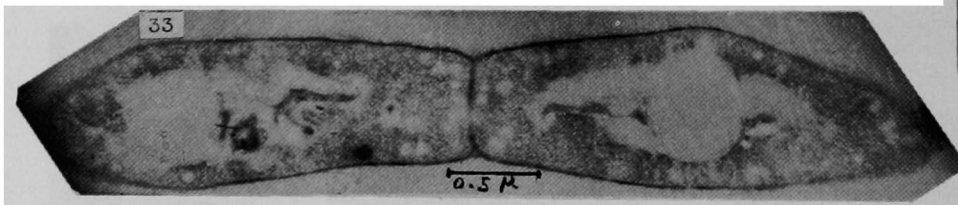
菅 論 文 附 圖



管論文附图



菅 論 文 附 圖



管 論 文 附 図

